

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. G. WEYRICH)

Die Phosphatasebestimmung als gerichtsmedizinischer Spermanachweis*

Von

G. HAUCK und H. LEITHOFF

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. März 1959)

A. Einleitung

Die Schwierigkeit des mikroskopischen Spermanachweises in der gerichtsmedizinischen Praxis hat das Bemühen um zuverlässige und weniger zeitraubende Untersuchungsmethoden nicht zur Ruhe kommen lassen. Mit Ausnahme des mikroskopischen Nachweises wohlhaltener Spermien können die allgemein üblichen sonstigen Methoden (Betrachtung im ultravioletten Licht¹, Kristallproben von FLORENCE² und PURANEN³) wegen ihrer Unspezifität oder wegen zu geringer Empfindlichkeit und Störanfälligkeit⁴ im Hinblick auf ihren Beweiswert nur als Vorproben angesehen werden.

Der erhebliche Fortschritt der Biochemie in den letzten 3 Jahrzehnten hat auch die gerichtsmedizinische Untersuchungstechnik um wertvolle fermentchemische Methoden bereichert. Eine davon ist der Nachweis saurer Phosphatasen bei der forensischen Spermauntersuchung.

In der hier vorgelegten Arbeit soll an Hand der Literatur und eigener Untersuchungen der Beweiswert der Phosphatasereaktion beim forensischen Spermanachweis überprüft werden.

B. Theoretische Grundlagen

Phosphatasen sind Fermente, die Phosphorsäureester synthetisieren und spalten^{5,6}. Die ersten derartigen Fermente wurden bei Untersuchungen über die alkoholische Gärung⁷⁻¹¹ und über den Zuckerstoffwechsel¹²⁻¹⁴ entdeckt. Die überragende Stellung energiereicher Phosphorverbindungen im intermediären Stoffwechsel¹⁴ der belebten Natur erfordert die Anwesenheit von Phosphatasen^{5,6}. Mit dem Vorhandensein von diesen Fermenten in biologischem Material ist deshalb zu rechnen.

* Unserem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. GÜNTHER WEYRICH, in Dankbarkeit zum 60. Geburtstag gewidmet.

Die Untersuchungen über die Artspezifität der Phosphatasen sind noch nicht abgeschlossen. Viele Arten enthalten mehrere Phosphorsäureester spaltende Enzyme. Als Einteilungsprinzip hat man unter anderem die p_H -Abhängigkeit der Fermentaktivität gewählt und spricht daher von „saurer“ und „alkalischen“ Phosphatasen^{5, 6}.

KUTSCHER und WOLBERGS¹⁵ wiesen schon 1935 auf das sehr reichliche Vorkommen saurer Phosphatasen in der menschlichen Prostata und im Ejaculat hin. Dieser Befund wurde durch zahlreiche Nachuntersucher¹⁶⁻²² bestätigt. Die Phosphatase der Prostata spielt wahrscheinlich für die Beweglichkeit der Spermatozoen eine wesentliche Rolle²⁰⁻²⁸. Von den bisher untersuchten Ejaculaten hat nur das der Primaten einen Gehalt an saurer Phosphatase, der mit dem des Menschen vergleichbar ist^{15, 29, 30}.

Aus diesem Grunde hat man sich der Phosphatasereaktion zum Nachweis menschlichen Samens bedient.

C. Untersuchungsmethoden

Es sind qualitative und quantitative Phosphatase-Untersuchungsmethoden angegeben worden.

Im europäischen Raum haben an qualitativen Untersuchungsmethoden die von WALKER³¹, BERG³²⁻³⁴ und BOLTZ und PLOBERGER³⁵ in die gerichtsmedizinische Praxis Eingang gefunden. WALKER benutzt als Substrat Ca- α -naphthylphosphat bei einem Reaktionspuffer von p_H 5. Das durch die Fermentwirkung frei gewordene α -Naphthol gibt beim Kuppeln mit Anthrachinon-1-diazoniumchlorid einen orangefarbenen Azofarbstoff³⁶. BERG hat die Methode WALKERS insofern verbessert, als er zum Kuppeln Dianisyltetrazoniumchlorid benutzt, das mit α -Naphthol eine besser erkennbare bläuliche Farbe gibt*. BOLTZ und PLOBERGER bedienen sich einer „Abklatschmethode“, wobei die leicht wasserlösliche Phosphatase durch Aufpressen feuchten Filterpapiers von dem verdächtigen Fleck eluiert wird. Die Fermentwirksamkeit wird in Anlehnung an die Arbeiten von HUGGINS und TALALAY³⁷ mit Phenolphthaleinphosphat nachgewiesen. Das durch die Fermente abgespaltene Phenolphthalein färbt sich beim Übersprühen^{38, 39} mit einem alkalischen Puffer rot. PLOBERGER und SOKOLOFF⁴⁰ haben diese Methode auch an Abstrichen des weiblichen Genitales in der gynäkologischen Sprechstunde überprüft.

BOLTZ und PLOBERGER beobachteten, daß bei Verwendung der von HUGGINS und TALALAY angegebenen Substratlösung auch anderes biologisches Material als menschliches Sperma eine positive Reaktion gibt. Um die Empfindlichkeit der Methode herabzusetzen, verdünnten sie die von HUGGINS und TALALAY angegebene Substratlösung. Die genannten Autoren haben richtig erkannt, daß es nicht genügen kann, lediglich saure Phosphatase nachzuweisen. Es ist vielmehr notwendig, sich ein Bild von der Größe der Fermentaktivität zu machen. Nur sehr hohe Fermentaktivitäten können einen Hinweis auf das Vorliegen menschlichen Ejaculates geben.

Diesem Umstand tragen die quantitativen Methoden Rechnung. Sie sind sehr vielgestaltig. Die wichtigsten sollen nachstehend angeführt werden.

* Die anfänglich beobachteten Fehlresultate (61) haben wir bei Verwendung der von der Firma P. Schuchardt nun hergestellten Reagentien zum Phosphatase-nachweis nach BERG nicht mehr gesehen.

SERVANTIE u. Mitarb.⁴¹ extrahieren die verdächtigen Flecken durch Aufpressen 1 cm² großer Filterpapierstückchen, die mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet sind. Schon nach 3 min wird das Filterpapier zerkleinert und in 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung extrahiert und zentrifugiert. In der überstehenden Flüssigkeit wird nach GOMORI⁴² mit Glycerophosphat bei pH 4,7 die Phosphataseaktivität bestimmt.

HANSEN⁴³ verwendet für die Extraktion der verdächtigen Flecken einen besonderen Apparat. Er inkubiert 0,25 ml des Extraktes mit 10 ml Puffer, der Phenylphosphat enthält, während 15 min. Nach Zugabe von Phenolreagens nach FOLIN-CIUCALTEU⁴⁴ beobachtet er bei Anwesenheit von saurer Phosphatase eine dunkle, tintenähnliche Farbe. Zur Messung muß die Endlösung oft verdünnt werden. HANSEN sieht eine Phosphataseaktivität von 2—4 Einheiten (E)/cm² als beweisend für menschliches Sperma an.

CARPENTER und WATSON⁴⁵ haben die Extraktionsapparatur HANSENS modifiziert. Sie arbeiten sonst nach dem gleichen Prinzip.

LUNDQUIST⁴⁶⁻⁴⁸, der in Anlehnung an die Methode HANSENS arbeitet, weist darauf hin, daß bei positivem mikroskopischem Befund der Phosphatasenachweis oft negativ ist. Andererseits sieht er aber bei einem negativen mikroskopischen Befund den Nachweis menschlichen Spermas als erbracht an, wenn größere Mengen saurer Phosphatase nachgewiesen werden können.

KAYE⁴⁹⁻⁵¹ sowie PEREZ DE PETINTO und MARTINEZ⁵² beziehen die gefundene Phosphataseaktivität ebenfalls auf 1 cm² des extrahierten Textilstückes. KAYE inkubiert bei 37° und pH 4,9 5 min mit Phenylphosphat. Er sieht 30 King Armstrong-Einheiten⁵³ (KAE)/cm² als beweisend für menschliches Sperma an. In Zweifelsfällen prüft er die Eiweißstoffe mit Hilfe der Präzipitinreaktion nach UHLENHUTH⁵⁴. PEREZ DE PETINTO und MARTINEZ untersuchten menschliche Ausscheidungen, Getränke und Speisen. Sie fanden nie mehr als 5 KAE/cm². Im menschlichen Sperma wurden 500—3500 KAE/cm² gefunden. Bei verdächtigen Flecken sehen PEREZ DE PETINTO und MARTINEZ 20 KAE/cm² als beweisend für menschliches Sperma an.

RIISFELD¹⁸ berücksichtigt nicht nur die Fläche der verdächtigen Spur, sondern auch die Dicke des Stoffes. Er extrahiert 1,88 mm³ mit 2 ml H₂O und sieht im Extrakt 20 E/ml als beweisend für menschliches Ejaculat an.

RASMUSSEN⁵⁵ sowie GILLI und FALLANI⁵⁶ beziehen die mit Phenylphosphat gemessenen Phosphataseeinheiten auf das Trockengewicht des Ejaculats. Die eluierten Trockensubstanzen bestimmen sie durch Differenzwägung. GILLI und FALLANI sehen 2 E/mg Trockensubstanz als beweisend für menschliches Ejaculat an.

FISHER⁵⁷, der ebenfalls Phenylphosphat als Substrat benutzt, bezieht die Phosphataseeinheiten auf die den Fleck verursachende Flüssigkeit. Mit Milch, die denselben Ausbreitungsfaktor haben soll wie menschliches Ejaculat, ermittelt er aus der Fleckengröße die Ejaculatmenge. Als beweisend für menschliches Sperma sieht FISHER 100 E/cm² der den Fleck verursachenden Flüssigkeit an.

D. Kritische Betrachtungen und eigene Untersuchungen

Es ist bekannt, daß im Sperma von Primaten^{15, 29, 30}, in vielen Tier-ejaculaten⁵⁸⁻⁶², in den Drüsen des Präputiums der Ratte¹⁶ und in den Samenblasen von Meerschweinchen¹⁶ saure Phosphatasen vorkommen. In der Bakteriologie dient die positive Phosphatasereaktion zur Differenzierung von Bakterienkulturen (Staph. aureus, Strept. pyogenes (haemolyticus), Haem. influenzae, Corynebact. xerosis und Hoffmanni)⁶³.

Sie wird ferner in Kartoffeln, Frauenmilch, Harn, Leber, Niere, Reiskleie, Süßmandeln, Luzernensamen, Schimmelpilzen⁵, Erythrocyten⁶⁴, Schlangengiften^{65, 66} und anderen Materialien nachgewiesen. Aus Hefe⁶⁷⁻⁷⁰, Niere, Reiskleie, Schlangengift⁷¹, Schweineleber⁷², Skelettmuskulatur⁷³, *Aspergillus niger*⁷⁴, Froscheiern⁷⁵ und Karotten⁷⁶ wurden mehr oder weniger reine Phosphatasepräparate dargestellt.

Wir untersuchten mit der verdünnten Substratlösung nach BOLTZ und PLOBERGER zahlreiche Pflanzenpreßsäfte^{60, 61, 77, 78}. Dabei ergaben die Preßsäfte von Blumenkohl, Rosenkohl, Klee, Malerblume, Lupine, Ackerwinde und Kornrade positive Reaktionen. Die Versuche wurden mit Pflanzenpreßsaft auf der Tüpfelplatte und mit auf Filterpapier angetrocknetem Saft durchgeführt. Der Reaktionsausfall war beim Saft des Blumenkohls und der Malerblume so intensiv wie bei der Untersuchung menschlichen Spermas. Im Mörser zerriebene Bakterienkulturen von *Staph. aureus*⁶¹ lieferten ebenfalls kräftige Farbreaktionen. Bei einzelnen Hundeejaculaten⁶¹ war unmittelbar nach der Zugabe des alkalischen Farbreaktionspuffers eine intensive, sich vertiefende Rotfärbung zu beobachten.

Es ist zu erwarten, daß neben den aufgezählten Medien noch viele andere aus der Umgebung des Menschen saure Phosphatase enthalten. Die mitgeteilten Befunde zwingen deshalb zu dem Schluß, daß das Vorhandensein saurer Phosphatase für menschliches Sperma nicht spezifisch ist. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß selbst mit dem verdünnten Substratpuffer nach BOLTZ und PLOBERGER zahlreiche Medien eine positive Reaktion ergeben. Bei Anwendung konzentrierterer Substratlösungen ist die Zahl der positiven Ausfälle naturgemäß größer.

Es muß auch vor Untersuchungsmethoden gewarnt werden, bei denen der Ausfall des Tests erst nach Zusatz eines alkalischen Farbreaktionspuffers erkennbar wird. Ein hoher Gehalt an alkalischer Phosphatase kann nämlich durch momentane Spaltung des Substrats beim Alkalisieren saure Phosphatase vortäuschen. Dies beobachteten wir an den Ejaculaten von Hunden und Stieren.

Die Arbeiten von BOLTZ und PLOBERGER³⁵, LUNDQUIST⁴⁸ und eigene Untersuchungen⁶¹ haben gezeigt, daß der negative Ausfall der Phosphatasereaktion die Anwesenheit von menschlichem Sperma nicht ausschließt. Dies ist einerseits durch die leichte Zerstorbarkeit der Phosphatasen zu erklären. Andererseits muß gelegentlich auch mit ungewöhnlich niedrigen Phosphatasegehalten menschlicher Samenflüssigkeit gerechnet werden. So z. B. bei krankhaften Zuständen der Prostata^{79, 80}. GUTMANN¹⁷ wies außerdem auf Grund der Untersuchung von Ejaculatfraktionen darauf hin, daß der Phosphatasegehalt der ersten und der letzten Ejaculatanteile verschieden hoch ist. Darüber hinaus

kann der Phosphatasegehalt des menschlichen Ejaculats durch hohe Gaben von Vitamin E gesenkt werden²².

Somit ist weder der positive Ausfall der qualitativen Phosphatase-reaktion für das Vorhandensein menschlichen Spermias beweisend, noch kann man aus dem negativen Ausfall der Reaktion auf die Abwesenheit menschlichen Ejaculats schließen.

Es bleibt zu untersuchen, welchen Beweiswert quantitative Bestimmungsmethoden der sauren Phosphatase im Rahmen unserer Fragestellung haben.

Quantitative Untersuchungen über das Ausmaß der Aktivität saurer Phosphatase in verschiedenen biologischen Medien liegen in großer Anzahl vor. Sie sind wegen der verschiedenen Substrate, verschiedener Verdünnungen und Inkubationszeiten nur bedingt miteinander vergleichbar (Tabelle 1).

Die Tabelle zeigt dennoch die erheblichen individuellen Schwankungen. Die gemessenen Phosphataseaktivitäten des menschlichen Spermias überschneiden sich im niedersten Bereich recht erheblich mit den Aktivitäten anderen biologischen Materials. Diese Überschneidung wird noch verstärkt, wenn bei der Untersuchung der Verdünnungseffekt nicht berücksichtigt wird. Nur bei hoher Verdünnung, die eine optimale Grenze nicht überschreiten darf, gelingt es, die Gesamtaktivität hochkonzentrierter Fermentlösungen zu erfassen. RAABE⁶⁴ u. a. haben auf die Wichtigkeit einer optimalen Verdünnung hingewiesen. Wir fanden in gleichen menschlichen Ejaculaten allein durch Veränderung der Verdünnung Differenzen der Phosphataseaktivität um 1—2 Zehnerpotenzen (Tabelle 2).

Den einzelnen quantitativen Bestimmungsmethoden haften neben dem Verdünnungseffekt zum Teil recht erhebliche Fehlermöglichkeiten an. Auf diese soll nachstehend kurz eingegangen werden.

Die von SERVANTIE⁴¹ benutzte Abklatschmethode kann weder quantitative, noch stets gleichmäßige Resultate liefern. HANSEN⁴³, CARPENTER und WATSON⁴⁵, LUNDQUIST⁴⁶⁻⁴⁸, KAYE⁴⁹⁻⁵¹ und PEREZ DE PETINTO und MARTINEZ⁵² versuchen konstante Untersuchungsbedingungen dadurch zu schaffen, daß sie eine bestimmte Fleckengröße stets mit der gleichen Flüssigkeitsmenge eluieren. Bei Anwesenheit größerer Mengen saurer Phosphatase ist die Farbintensität der zu messenden Lösung so groß, daß das Lambert-Beersche Gesetz⁸⁴⁻⁸⁶ nicht mehr gilt. Von einer quantitativen Bestimmung kann dann keine Rede mehr sein.

Die Ejaculatmenge ist jedoch nicht nur durch die Fleckengröße zu erfassen, wesentlich ist auch die Dicke des Stoffes (RIISFELDT¹⁸) und das Ausmaß seiner Durchtränkung. Die Problematik der Wägemethode, die RASMUSSEN⁵⁵ sowie GILLI und FALLANI⁵⁶ anwenden, besteht darin, daß Spermien und Eiweißstoffe unter Umständen nicht eluiert werden, andererseits aber Textilhilfsstoffe in Lösung gehen können. Am erfolgversprechendsten scheint uns noch die von FISHER⁵⁷ angegebene Methode zu sein, wenn sie auch nur eine grobe Schätzung erlaubt.

Tabelle I. Werte saurer Phosphatase in verschiedenem Material

Autor	Substrat	pH	Maximum	Minimum	Verdünnung	Medium	Inkubationszeit min
NIKOLOWSKY ²⁰	Glycerophosphat	3,7	520 P ₂ O ₅ /0,001 ml	5 P ₂ O ₅ /0,001 ml	1:700	menschliches Sperma	30
GUTMAN ¹⁷	Phenylphosphat	4,9	3700 GE*/ml	33 GE/ml		menschliches Sperma	60
PEREZ DE PETINTO ⁵²	Phenylphosphat	4,9	3500 KAE/ml	500 KAE/ml		menschliches Sperma	15
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9	2284 GE/g	522 GE/g		menschliche Prostata	60
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9		35,6 GE/g		Hundprostata	
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9		2,8 GE/g		Katzenprostata	
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9		1,9 GE/g		Kaninchenprostata	
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9		3,9 GE/g		Meerschweinchenprostata	
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9		2,9 GE/g		Rattenprostata	
GUTMAN ¹⁶	Phenylphosphat	4,9	104 GE/g	27,4 GE/g		Präputialdrüse der Ratte	
KUTSCHER-WÖRNER ⁸¹	β -Glycerophosphat	4—5,6	250 mg P ₂ O ₅	100 mg P ₅ O ₂		menschlicher Ejaculat-extrakt	60
ERDMANN-MÜLLER ⁸²	Phenylphosphat	4,9	3 GE/100 ml	1 GE/100 ml		menschliches Serum	60
GUTMAN ¹⁷	Phenylphosphat	4,9	1134 GE/g	356 GE/g		Rhesus-Affen-Prostata	
HAUCK-LEITHOFF ⁶¹	Phenylphosphat	4,9	280 GE/100 ml	160 GE/100 ml	1:10	Stierejaculat	60
HAUCK-LEITHOFF ⁶¹	Phenylphosphat	4,9	540 GE/100 ml	80 GE/100 ml	1:10	Hundeejaculat	60
HAUCK-LEITHOFF ⁷⁸	Phenylphosphat	4,9	3800 GE/100 ml	1320 GE/100 ml	1:10	Blumenkohlpresse-saft	60
HAUCK-LEITHOFF ⁷⁸	Phenolphthaleinphosphat	4,9	3250 HE/100 ml	550 HE**/100 ml	1:100	Blumenkohlpresse-saft	120
					1:10		
HAUCK-LEITHOFF ⁷⁸	Phenylphosphat	4,9	10000 GE/100 ml	5250 GE/100 ml	1:500	Malerblume	60
HAUCK-LEITHOFF ⁷⁸	Phenolphthaleinphosphat	4,9	11100 HE/100 ml	2300 HE/100 ml	1:500	Malerblume	120
HAUCK-LEITHOFF	Phenolphthaleinphosphat	5,1		247 HE/100 ml	1:10	Staph. Eiter	120
HAUCK-LEITHOFF	Phenylphosphat	4,8		440 GE/100 ml	1:10	Staph. Eiter	60

* GE = Gutmann-Einheiten. ** HE = Huggins-Einheiten.

Tabelle 2. *Einfluß der Verdünnung auf die gefundene Phosphataseaktivität*

Verdünnung	Stier Münzer	Mensch 627	Mensch 628	Mensch 683	Mensch 684
Gutman-Einheiten/100 ml (Phenylphosphat)					
1:10	127	5350	5150		
1:20	127				
1:40	152				
1:100		45000	43000		
1:1000		61000	47500	455000	465000
1:10000				582000	1665000
Huggins-Einheiten/100 ml (Phenolphthaleinphosphat)					
1:10	210	570	570		
1:20	246				
1:40	140				
1:100		6050	5850		
1:1000		42400	41000	63600	67000
1:10000				326000	593000

Trotz aller Vorkehrungen ermöglicht keine dieser Methoden eine genaue quantitative Bestimmung der Phosphataseaktivität in verdächtigen Flecken. Noch weniger ist ein zuverlässiger Rückschluß auf die Fermentaktivität der Flüssigkeit möglich, die einen solchen Fleck verursachte. Auf die wesentliche Bedeutung des Verdünnungseffektes und die hierdurch gegebene Unsicherheit wurde bereits hingewiesen. Die Verdünnung der Fermentlösung nach dem Eluieren kann auch nicht annähernd geschätzt werden, da nicht bekannt ist, welcher Anteil der ursprünglichen Phosphatase inaktiviert wurde und welche Menge sich wegen Absorption an Textilien, Textilhilfsstoffen und Schmutz der Elution entzieht.

Bei den hohen Konzentrationen an saurer Phosphatase, die vielfach bei positiven Befunden in den Eluaten der Flecke gefunden werden, reicht die eingesetzte Substratmenge nicht aus, um die gesamte Aktivität zu erfassen. Es genügt nicht, die Endlösung zu verdünnen, um in den Geltungsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes zu kommen. Vielmehr ist es notwendig, die Eluatmenge im Ansatz zur quantitativen Phosphatasebestimmung geringer zu wählen oder das Eluat stark zu verdünnen. Noch besser ist es, die verdächtigen Flecken mit einer größeren Flüssigkeitsmenge zu eluieren. Mit den geschilderten Untersuchungsmethoden, die auf Nachweisverfahren geringer Phosphatasemengen zurückgehen^{36, 37, 42, 53}, können nur niedrige Phosphatasekonzentrationen bestimmt werden.

Die empirisch gewonnenen Werte, oberhalb deren ein verdächtiger Fleck als durch menschliches Ejaculat verursacht angesehen wird,

differieren untereinander erheblich. Sie scheinen nach unseren Erfahrungen bei den hohen Anforderungen, die an die gerichtsmedizinische Beweisführung zu stellen sind, zu niedrig zu sein. Die Tabelle 3, in der die mit unserer Arbeitsmethode vergleichbaren Grenzwerte aufgeführt sind, zeigt, daß die Phosphataseaktivität der Malerblume dem Grenzwert, den GILLI und FALLANI angegeben haben, bedenklich nahe kommt. Der Grenzwert FISHERS wird durch die Phosphataseaktivität der Malerblume erreicht. Die Möglichkeit, daß andere pflanzliche oder tierische Säfte einen noch höheren Gehalt an saurer Phosphatase aufweisen, muß offenbleiben, bis alles Material der menschlichen Umwelt untersucht wurde.

Tabelle 3. *Physiologische Werte der Phosphataseaktivität und Grenzwerte bei der Spurenuntersuchung*

Einheiten pro 100 ml		
menschlichen Spermas		anderen Materials
	580	Hundeejaculat*
	1860	Blumenkohlpreßsaft*
GUTMAN, Minimum	3300	
	3820	Blumenkohlpreßsaft*
Mensch 628 1:10 *	5150	
Mensch 627 1:10 *	5350	
	9750	Preßsaft der Malerblume *
Grenzwert FISHER	10000	
	10000	Preßsaft der Malerblume *
Grenzwert GILLI	20000	
Mensch 622 1:100 *	48750	
Mensch 683 1:10000 *	582000	
Mensch 684 1:10000 *	1665000	

* Eigene Untersuchungen.

Es ist bekannt, daß tierisches Ejaculat im Gegensatz zu menschlichem nicht unbeträchtliche Mengen alkalischer Phosphatase enthält¹⁶. Wir versuchten daher mit Hilfe der Untersuchung der p_H -Optima der Fermentaktivität menschliches Ejaculat von anderen phosphatasehaltigen Flüssigkeiten zu unterscheiden. Bei der Darstellung der Fermentaktivität in Abhängigkeit vom p_H -Wert waren bemerkenswerte Unterschiede zwischen menschlichem Ejaculat, tierischem Ejaculat und Pflanzenpreßsäften festzustellen (Abb. 1—8). Es resultierten hierbei recht typische Kurven, die im Normalfall eine Differenzierung ermöglichen. Solche typischen Kurven können nur bei optimaler Verdünnung erhalten werden. Um diese herauszufinden, bedarf es mehrerer Vorversuche. Im Einzelfall leidet die Zuverlässigkeit dieser Art der Differenzierung an der großen individuellen Schwankungsbreite (Abb. 9—12). Es werden mitunter völlig atypische Kurvenverläufe gesehen.

Die kurvenmäßige Darstellung der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit vom p_H -Wert gestattet sicherere Aussagen als die geläufigen

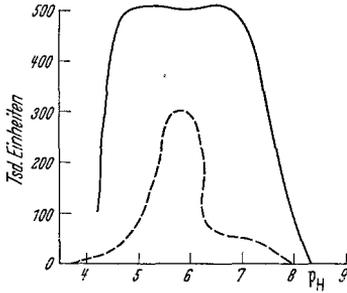


Abb. 1

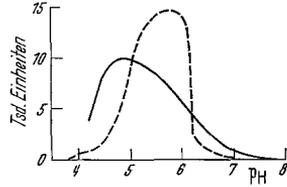


Abb. 2

Abb. 1. Menschliches Sperma 683. Verdünnung 1:10000 bei p_H 3,5—7,5; 1:100 bei p_H 7,5—10,5. — Gutman-Einheiten (Phenylphosphat)/100 ml Sperma. --- Huggins-Einheiten (Phenolphthaleinphosphat)/100 ml Sperma

Abb. 2. Preßsaft der Malerblume. Verdünnung 1:500. — GE/100 ml Saft; --- HE/100 ml Saft

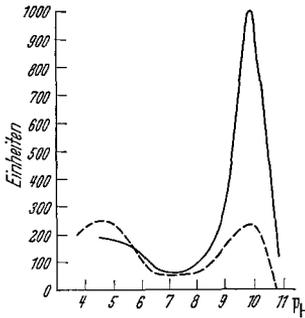


Abb. 3

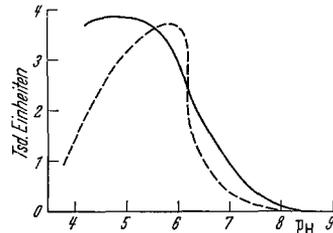


Abb. 4

Abb. 3. Stierejaculat (Axel). Verdünnung 1:10. — GE/100 ml Ejaculat; --- HE/100 ml Ejaculat

Abb. 4. Preßsaft von Blumenkohl. Verdünnung 1:10 (GE), 1:100 (HE). — GE/100 ml Saft; --- HE/100 ml Saft

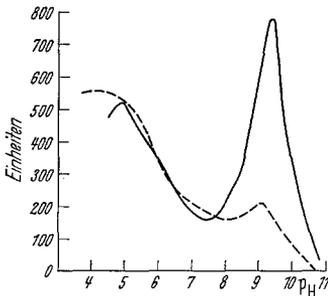


Abb. 5

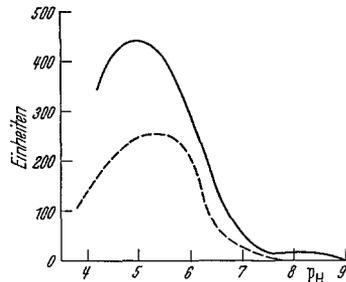


Abb. 6

Abb. 5. Hundeejaculat (6). Verdünnung 1:10. — GE/100 ml Ejaculat; --- HE/100 ml Ejaculat

Abb. 6. Staphylokokkeneiter. Verdünnung 1:10. — GE/100 ml Eiter; --- HE/100 ml Eiter

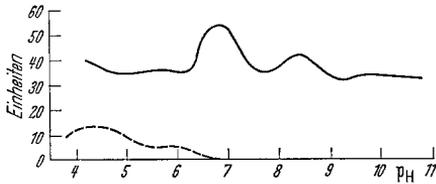


Abb. 7. Ejaculat des Ebers (I). Verdünnung 1:3. — GE/100 ml Ejaculat; --- HE/100 ml Ejaculat

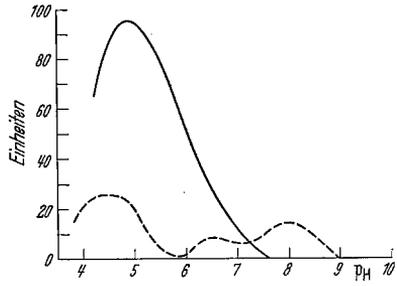


Abb. 8. Staphylokokkeneiter mit Formol. Verdünnung 1:10. — GE/100 ml Eiter; --- HE/100 ml Eiter

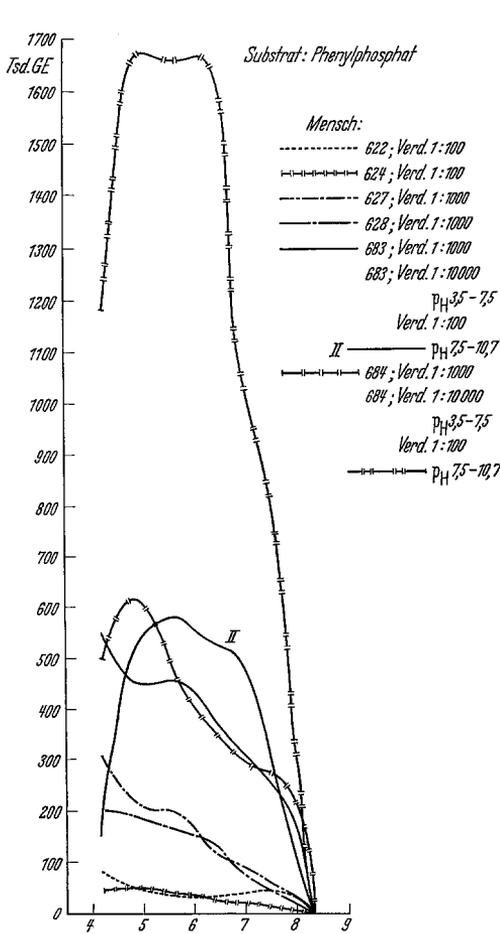


Abb. 9. Ejaculate von Menschen. Phenylphosphat (GE)

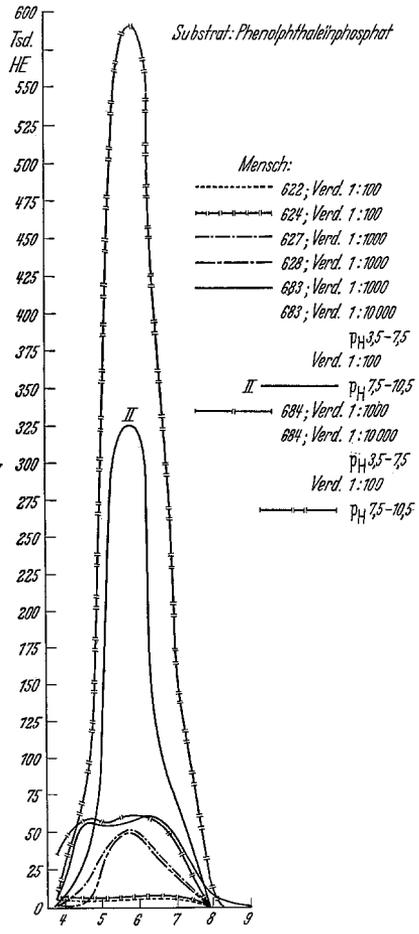


Abb. 10. Ejaculate von Menschen. Phenolphthaleinphosphat (HE)

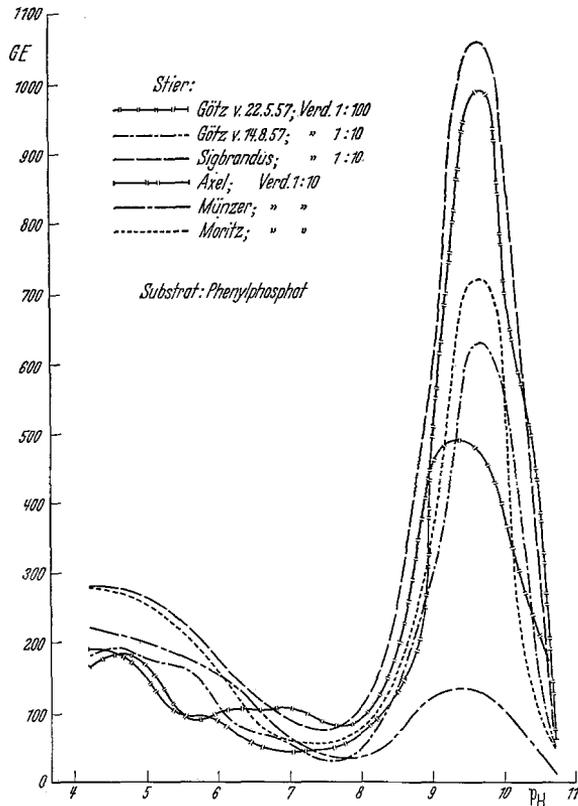


Abb. 11. Ejaculate von Stieren. Phenylphosphat (GE)

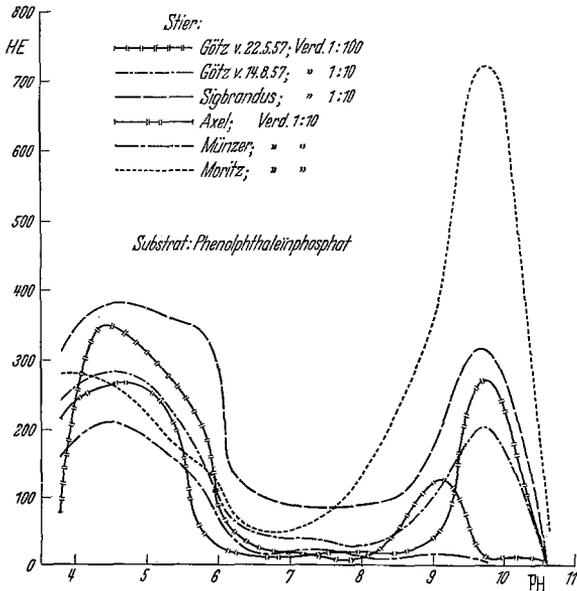


Abb. 12. Ejaculate von Stieren. Phenolphthaleinphosphat (HE)

quantitativen Bestimmungsmethoden. Für die gerichtsmedizinische Spurenkunde ist sie jedoch im allgemeinen nicht brauchbar, da nur in den seltensten Fällen das zur Verfügung stehende Material für diese Untersuchung ausreicht. Der Arbeitsaufwand ist darüber hinaus so erheblich, daß man schneller und sicherer mit der bisher üblichen mikroskopischen Untersuchungstechnik zum Ziele kommt.

E. Schlußfolgerungen

Als Ergebnis der vorstehenden Betrachtungen sind folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Der qualitative Nachweis saurer Phosphatase in einem verdächtigen Fleck kann nicht als beweisend für das Vorliegen menschlichen Ejaculats angesehen werden. Er leistet als Vorprobe hervorragende Dienste, um dem Untersucher zu zeigen, an welcher Stelle des Beweistückes die mikroskopische Untersuchung anzusetzen hat. Bei negativem Ausfall der Phosphatasereaktion kann auf den Versuch des mikroskopischen Nachweises nicht verzichtet werden.

2. Die Spitzenwerte der Aktivität saurer Phosphatase in menschlichem Ejaculat wurden bisher in keinem anderen biologischen Material gefunden. Die angegebenen Grenzkonzentrationen an saurer Phosphatase, oberhalb deren von einigen Autoren der Nachweis menschlichen Ejaculats als erbracht angesehen wird, sind zu niedrig. Auch die quantitative Phosphatasebestimmung ist in ihrer Beweiskraft dem mikroskopischen Spermanachweis erheblich unterlegen.

3. In Fällen von Aspermie und hochgradiger Oligospermie wird der in solchen fermentchemischen Untersuchungen erfahrene Gutachter beim Vorliegen sehr hoher Mengen saurer Phosphatase in Gesamtwürdigung des Falles das Vorliegen menschlichen Ejaculats als sehr wahrscheinlich ansehen können. Die Sicherheit seiner Feststellungen wird erhöht, wenn die p_H -Abhängigkeit der Fermentaktivität für Phosphatase des menschlichen Ejaculats typisch ist.

F. Summary

By discussion of the literature and the results of own investigations the question was critical proved, if the detection or the determination of acid phosphatase can furnish evidence of the presence of human semen.

Phosphatases exists everywhere in biological materials; therefore only the detection of this ferment do not evidence the presence of human semen.

In some species of cole and garden-flowers the activity of acid phosphatase is so expansive, that also the power of evidence of detection of phosphatases in suspected material is reduced. The limits of

phosphatase units in literature regarded as evidence of human semen are too low. The power of evidence of determination of phosphatase in detection of semen is intensified if the p_{H} -dependence of activity of phosphatase in the specimen is congruent with that of human semen. Neither the positive nor the negative result of phosphatase-test can spare the microscopical investigation of specimen.

Literatur

- ¹ (a) LEDDEN-HULSEBOSCH, C. J. VAN: Verwendung der ultravioletten Strahlen in der Kriminalistik. Arch. Kriminol. **78**, 1 (1926). — (b) ITO, T.: Über einige Anwendungen ultravioletter Strahlen zu gerichtlich-medizinischen Zwecken. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **9**, 726 (1927). — KOOPMANN: (c) Nicht-Fluoreszenz von Sperma. Arch. Kriminol. **106**, 47 (1940). — (d) Erlaubt die Beschaffenheit eines frischen Ejaculats Schlüsse auf die Zeit, zu der das Ejaculat abgesondert wurde? Arch. Kriminol. **109**, 48 (1941). — ² FLORENCE: Du sperme et de taches des sperme en médecine légale. Arch. d'Antrop. crimin. **21** (1897). — ³ (a) PURANEN, U. H.: Eine neue mikrochemische Methode zur Identifizierung von Sperma. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **26**, 366 (1936). — (b) BERG, ST.: Der Spermanachweis nach Puranen und seine forensische Bedeutung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **39**, 283 (1948). — ⁴ MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953; dort weitere Literatur. — ⁵ BERSIN, TH.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig 1954. — ⁶ COLOWICK, S. P., and N. O. KAPLAN: Methods in Enzymology. New York 1955. — ⁷ HARDEN, A., u. W. J. YOUNG: Der Einfluß von Phosphatase auf die Gärung der Glukose durch Hefesaft. Proc. chem. Soc. **21**, 189 (1905). — ⁸ NEUBERG, C.: Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Jena 1913. — ⁹ WARBURG, O.: Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glykolyse. Biochem. Z. **152**, 51 (1924). — ¹⁰ MEYERHOF, O., u. K. LOHMANN: Über das Co-Fermentsystem der Milchsäurebildung. Naturwiss. **20**, 387 (1932). — ¹¹ MEYERHOF, O.: Neuere Untersuchungen über die Reaktionskette der alkoholischen Gärung. Helv. chim. Acta **18**, 1030 (1935). — ¹² CORI, G. T., S. D. COLOWICK u. C. F. CORI: Die Bildung von Glukose-1-phosphorsäure in Gewebsextrakten von Säugern und Hefeextrakten. J. biol. Chem. **123**, 375 (1938). — ¹³ CORI, C. F.: Enzymatic breakdown and synthesis of carbohydrate. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **7**, 260 (1939). — Vgl. auch: J. biol. Chem. **151**, 21 (1943). — CORI, G. T.: Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen-storage disease. Harvey Lect., Ser. XLVIII. 145 (1954). — ¹⁴ LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Berlin 1957. — ¹⁵ KUTSCHER, W.: Über Harnphosphatase. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **235**, 62 (1935). — KUTSCHER, W., u. H. WOLBERGS: Prostataphosphatase. I. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **236**, 237 (1935). — ¹⁶ GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: Acid phosphatase and functional activity of the prostata of man and praeputial glands of the rat. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **39**, 529 (1938). — ¹⁷ GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: Quantitative relations of a prostatic component (acid phosphatase) of human seminal fluid. Endocrinology **28**, 115 (1941). — ¹⁸ RIISFELDT, O.: Acid phosphatases employed as new method of demonstrating seminal spots in forensic medicine. Acta path. microbiol. scand. Suppl. **58**, 1 (1946). — ¹⁹ LUNDQUIST, F.: Studies on the biochemistry of human semen. Acta physiol. scand. **13**, 322 (1947). — Some properties of prostatic phosphatase. Acta physiol. scand. **14**, 263 (1947). — ²⁰ NIKOLOWSKY, W.: Beziehungen zwischen Prostataphosphatase und Spermafund. Derm. Wschr. **120**, 132 (1949). — ²¹ NIKOLOWSKY, W.: Beziehungen

und Abhängigkeiten von Spermio-genese und Prostatasekretion. *Derm. Wschr.* **120**, 237 (1949). — ²² NIKOLOWSKY, W.: Der Gehalt des Ejakulates an Phosphatase bei wiederholten Untersuchungen ohne und mit medikamentöser Behandlung im Intervall. *Z. Urol.* **43**, 94 (1950). — ²³ LISSMANN: Die Sexualfunktionen der Prostatektomierten. *Klin. Wschr.* **1928**, 331. — ²⁴ FÜHRBRINGER: Repetitorien d. prakt. Sexualmedizin. *Dtsch. med. Wschr.* **1928**, 2020; **1929**, 232, 444. — ²⁵ LANZ, T. v.: Die Samenspeicherung beim Mann. *Klin. Wschr.* **1936 II**, 993. — ²⁶ STEINACH, E.: Zur Geschichte des männlichen Sexualhormons und seiner Wirkungen am Säugetier und beim Menschen. *Wien. klin. Wschr.* **49**, 161 (1936). — ²⁷ GEISSEN-DÖRFER, R.: Prostata. Leipzig 1940. — ²⁸ KIMMIG, J.: Die Biochemie des menschlichen Spermas. I. Symp. der Dtsch. Ges. für Endokrinol., 1955, S. 171. — ²⁹ KUTSCHER, W., u. J. PANY: Prostataphosphatase. III. Hoppe-Seylers *Z. physiol. Chem.* **255**, 169 (1938). — ³⁰ HUGGINS, C.: The physiology of the prostate gland. *Physiol. Rev.* **25**, 281 (1945). — ³¹ WALKER, J. T.: A new test for seminal stains. *New Engl. J. Med.* **242**, 110 (1950). — ³² BERG, ST. P.: Methoden zum Nachweis von Genitalsekretspuren. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **42**, 605 (1954). — ³³ BERG, ST. P.: Neue Methoden für die Beweismitteluntersuchung bei Sittlichkeitsdelikten. *Kriminalistik* **8**, H. 5 (1954) *Beilage Kriminalwiss.* **1**, 25 (1954). — ³⁴ BERG, ST. P.: Eine neue Methode zum Nachweis von Spermaflecken. *Internat. kriminalpol. Rev.* **10**, 53 (1955). — ³⁵ BOLTZ, W., u. U. PLOBERGER: Der enzymatische Nachweis kleinster Mengen menschlichen Ejakulates in der forensischen Praxis. *Arch. Kriminol.* **117**, 17 (1956). — ³⁶ SELIGMAN, A. M., and L. H. MANHEIMER: New method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *J. nat. Cancer Inst.* **9**, 427 (1949). — ³⁷ HUGGINS, C., and R. TALALAY: *J. biol. Chem.* **159**, 399 (1945). *Zit. nach E. MERCK, Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden.* Weinheim 1956. — ³⁸ WALLENFELS, K., u. E. v. PECHMANN: Über die Trennung von Enzymgemischen durch Elektrophorese in Filterpapier. *Angew. Chem.* **63**, 44 (1951). — ³⁹ EISENFELD, G., u. E. KOCH: Das Verhalten der alkalischen und sauren Serum-phosphatase des Menschen bei der Papierelektrophorese. *Z. ges. inn. Med.* **9**, 514 (1954). — ⁴⁰ PLOBERGER, U., u. D. SOKOLOFF: Der enzymatische Nachweis von Ejakulatspuren im weiblichen Geschlechtsteil. *Arch. Kriminol.* **119**, 20 (1957). — ⁴¹ SERVANTIE, L'EPÉE, LAZARINI et LARRARD: Taches des sperme et phosphatases acides. „Méthode des empreintes“. *Trav. du 26. Congr. Internat. de Méd. lég. Méd. Soc. du travail de Langue Franc.* 1953, S. 355. — ⁴² GOMORI, G.: The study of enzymes in tissue sections. *Amer. J. clin. Path.* **16**, 347 (1946). — ⁴³ HANSEN, P. F.: Determination of the prostatic acid phosphatase as a new method for the medico legal of sperm-spots. *Acta path. microbiol. scand.* **23**, 187 (1946). — ⁴⁴ FOLIN, O., u. V. CIOCALTEU: Über Tyrosin- und Tryptophanbestimmungen in Proteinen. *J. biol. Chem.* **73**, 627 (1927). — ⁴⁵ CARPENTER, E. D., and E. M. WATSON: The medicolegal use of the acid phosphatase test for the identification of seminal stains. *Canad. J. med. Technol.* **9**, 1 (1947). — ⁴⁶ LUNDQUIST, F.: *Nord. Med.* **28**, 2131 (1945). *Zit. nach* **48**. — ⁴⁷ LUNDQUIST, F.: *Acta Med. leg. soc. (Liège)* **1** (1948). — ⁴⁸ LUNDQUIST, F.: Medicolegal identification of seminal stains using the acid phosphatase test. *Arch. Path. (Chicago)* **50**, 395 (1950). — ⁴⁹ KAYE, S.: Identification of seminal Stains. *J. Crim. Law. Criminol.* **38**, 79 (1947). — ⁵⁰ KAYE, S.: Acid phosphatase test for identification of seminal stains. *J. Lab. clin. Med.* **34**, 728 (1949). — ⁵¹ KAYE, S.: The acid phosphatase tests for seminal stains. A study of reliability of aged stains. *Amer. J. Police Sci., in J. Crim. Law. Criminol.* **41**, 834 (1951). — ⁵² PEREZ DE PETINTO, J., y A. MARTINEZ: Nuevo método para la determinación de las manchas espermáticas. *Rev. Med. legal (Madr.)* **8**, 483 (1953). Siehe auch J. ST. FOULDS, Phosphatase in dried seminal stains. *Edinb.*

med. J. **58**, 94 (1951). — ⁵³ KING, E. J., and A. ARMSTRONG: A convenient method for the determining serum and bile phosphatase activity. *Canad. med. Ass.* **31**, 376 (1934). — ⁵⁴ UHLENHUTH, P.: Über die Entwicklung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens im Dienste der gerichtlichen Medizin unter besonderer Berücksichtigung eigener Forschungsergebnisse (Persönl. Erinnerungen). *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **39**, 309 (1948); dort weitere Literatur. — ⁵⁵ RASMUSSEN, M. P. S.: *Ann. Méd. lég.* **25**, 109 (1945). *Zit. nach* 48. — ⁵⁶ GILLI, R., e M. FALLANI: La diagnosi di sperma mediante la ricerca della fosfatasi acida. *Minerva med.-leg. (Torino)* **72**, 26 (1952). — ⁵⁷ FISHER, R. S.: Acid phosphatase tests as evidence of rape. *New Engl. J. Med.* **240**, 783 (1949). A new test for seminal stains. *New Engl. J. Med.* **242**, 110 (1950). — ⁵⁸ KUTSCHER, W., u. J. PANY: Prostataphosphatase. III. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **255**, 169 (1938); dort weitere Literatur. — ⁵⁹ GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: Adult phosphatase levels in prepubertal rhesus prostate tissue after testosterone propionate. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **41**, 277 (1939). — ⁶⁰ LEITHOFF, H., u. G. A. KUZIAS: Über den Beweiswert des Nachweises saurer Phosphatase bei der forensischen Spermauntersuchung. 35. Tagg der Dtsch. Ges. für ger. soz. Med., Marburg 1956. *Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 260 (1957). — ⁶¹ LEITHOFF, H., u. G. A. KUZIAS: Der forensische Spermanachweis in verdächtigen Flecken mittels der sauren Phosphormonoesterase. *Arch. Kriminol.* **120**, 9 (1957). — ⁶² HAUCK, G., L. KARLE u. H. LEITHOFF: Beitrag zur Kenntnis der Phosphatasen im Ejakulat von Haustieren. *Zuchthyg.* **3**, 144 (1959). — ⁶³ HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie, S. 672. Stuttgart 1955. — ⁶⁴ RAABE, S.: Die Bedeutung routinemäßiger Phosphatasebestimmungen in klinischen Labors. *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **74**, 652 (1955). — ⁶⁵ KAISER, E., u. H. MICHL: Die Biochemie der tierischen Gifte. Wien 1958. — ⁶⁶ RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956. — ⁶⁷ NEUBERG, C., u. L. KARZAG: Über zuckerfreie Hefegärungen. *Biochem. Z.* **36**, 60 (1911). — ⁶⁸ KUNITZ, M., and M. R. McDONALD: Crystalline hexokinase (heterophosphatase). Method of isolation and properties. *J. gen. Physiol.* **29**, 393 (1946). — ⁶⁹ BERGER, L., W. SLEIN, S. P. COLOWICK, and C. CORI: Isolation of hexokinase from baker's yeast. *J. gen. Physiol.* **29**, 379 (1946). — ⁷⁰ HEPPEL, L. A., and R. J. HILMOE: Purification of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. biol. Chem.* **192**, 87 (1951). — ⁷¹ UZAWA, S.: The phosphoesterases of bran. *J. Biochem.* **15**, 1 (1932). — The phosphomonoesterase and the phosphodiesterase. *J. Biochem.* **15**, 19 (1932). — ⁷² BAMANN, E., u. H. GALL: Isodynamische Pyrophosphatasen und ihre Identifizierung. *Biochem. Z.* **293**, 1 (1937). — ⁷³ GREEN, A. A., G. T. CORI, and C. F. CORI: Crystalline muscle phosphorylase. *J. biol. Chem.* **142**, 447 (1942). — ⁷⁴ MANN, T.: The metabolism of mold fungi. I Phosphorus metabolism in molds. *Biochem. J.* **38**, 339 (1944). — ⁷⁵ HARRIS, D. L.: Phosphoprotein phosphatase, a new enzyme from the frog egg. *J. biol. Chem.* **165**, 541 (1946). — ⁷⁶ HANAHAN, D. J., and L. CHAIKOFF: A new phospholipide splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J. biol. Chem.* **169**, 699 (1947). — ⁷⁷ HAUCK, G., u. H. LEITHOFF: Unterschiede zwischen den Phosphatasen des Menschen- und Tierspermas. *Vortr.* 36. Tagg der Dtsch. Ges. für ger. soz. Med. Heidelberg 1957. *Ref. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **47**, 77 (1958). — ⁷⁸ HAUCK, G., u. H. LEITHOFF: Beobachtungen über das Vorkommen von Phosphatasen in Gartenpflanzen. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **99**, 351 (1959). — ⁷⁹ NIKOLOWSKY, W.: *Med. Mschr.* **1949**, 843. *Zit. nach* NIKOLOWSKY ⁸⁰. — ⁸⁰ NIKOLOWSKY, W.: Über die Abwegigkeiten der Prostatasekretion bei Prostatorrhöe. *Z. Urol.* **43**, 233 (1950). — ⁸¹ KUTSCHER, W., u. A. WÖRNER: Prostataphosphatase. II. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **239**, 109 (1936). —

⁸² ERDMANN-MÜLLER, G. J.: Klinisch-chemische Untersuchungsmethoden für das Photometer „Eppendorf“. Hamburg: Netheler & Hinz. — ⁸³ GUTMAN, A. B., and E. B. GUTMAN: An „acid“ phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. J. clin. Invest. **17**, 473 (1938). — ⁸⁴ LAMBERT, H.: Photometria, sive de mensura et gradibus luminis colorum et umbrae. 1760. — ⁸⁵ BEER, A.: Bestimmung der Absorption des roten Lichts in farbigen Flüssigkeiten. Ann. Physik **86**, 78 (1852). — ⁸⁶ KORTÜM, G.: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

Dr. G. HAUCK und Dr. H. LEITHOFF,
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Freiburg i. Br.,
Katharinenstr. 23